玉米赤霉烯酮对体外培养鸡脾脏淋巴细胞凋亡的影响[1]

李欣虹[1] 郑若愚[1] 辜彦霏[1] 陶思邑[1] 任志华[1] 王亚超[2] 邓俊良[1*]

（1.四川农业大学动物医学院，成都 611130；2.西南科技大学，绵阳 621010）

摘 要：本试验旨在研究玉米赤霉烯酮(ZEA)对体外培养鸡脾脏淋巴细胞凋亡的影响。ZEA 染毒浓度为 0（对照）、0.10、0.40、1.60、6.25 和 25.00 μg/mL，染毒 48 h 后检测体外培养鸡脾脏淋巴细胞凋亡率、坏死率、细胞线粒体膜电位、细胞内活性氧（ROS）以及 B 淋巴细胞瘤－2(*Bcl*-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(*Bax*)、*Bak*-1、*p*53 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶－3(caspase-3) mRNA 表达量及细胞培养液上清中相应凋亡基因蛋白含量。结果显示，与对照组比较，ZEA 染毒导致鸡脾脏淋巴凋亡率、坏死率、ROS 含量、细胞培养上清液中 p53、Bax、Bak-1 及 caspase-3 的含量以及细胞内 *p*53、*Bax*、*Bak*-1 及 caspase-3 的 mRNA 表达量显著或极显著提高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)，且随毒素浓度升高而升高；而 ZEA 组细胞线粒体膜电位和上清液 Bcl-2 含量却极显著低于对照组($P<0.01$)。由此可知，ZEA 染毒可促进体外培养鸡脾脏淋巴细胞凋亡，且呈剂量依赖性。

关键词：玉米赤霉烯酮；鸡脾脏淋巴细胞；凋亡；线粒体；活性氧

中图分类号：S816

玉米赤霉烯酮(ZEA)又称F-2毒素，是由镰刀菌(主要是禾谷镰刀菌，此外为三线镰刀菌、木贼镰刀菌、雪腐镰刀菌以及粉红镰刀菌等)产生的一种类雌激素样霉菌毒素，在霉变的谷类作物和动物性食品中广泛存在。ZEA可促进细胞凋亡。Kim等[1]研究发现，ZEA可导致小鼠精细胞严重损害，出现不同程度的凋亡小体，且随着作用时间延长和浓度增加而加重，精原细胞和精母细胞表现更明显。余增丽等[2]对乳腺癌的MCF-7细胞研究发现ZEA对

收稿日期：2018－01－05

基金项目：国家自然科学基金项目(31402269)；四川农业大学 2018 年本科生科研兴趣培养计划项目

作者简介：李欣虹(1997—)，女，四川凉山人，本科生，从事动物中毒病理研究。E-mail: 1871426174@qq.com

*通信作者：邓俊良，教授，博士生导师，E-mail: dengjl213@126.com

细胞的增殖活性是通过调节B淋巴细胞瘤－2（*Bcl*-2）基因和Bcl-2相关X蛋白（*Bax*）基因的表达抑制了细胞凋亡所获得的，且ZEA可以显著提高细胞色素P450家族1亚科A多肽1（CYP1A1）酶的活性及其mRNA表达。邓友田等[3]也研究得出ZEA能够促进*Bc1*-2 mRNA和蛋白表达，而抑制*Bax*的表达，ZEA可提高人乳腺癌细胞系——MCF27细胞增殖活力并促进有丝分裂指数，并通过对*Bc1*-2和*Bax*表达的调节作用，抑制雌激素耗尽所诱导的MCF27细胞凋亡。符达[4]给大鼠饲喂不同剂量的ZEA发现，ZEA可对大鼠*p*53基因第8外显子的构象产生影响，导致外显子中2个条带上碱基对出现以嘧啶与嘌呤的互换突变为主的突变。而*p*53基因与细胞周期生长的调节、细胞转化的调节、DNA复制及诱导程序性死亡有密切关系，*p*53基因通过*Bal*-2家族作用调控细胞凋亡[5]。在Yu等[6]关于ZEA诱导小鼠RAW264.7巨噬细胞死亡机制的研究中，ZEA染毒处理导致细胞线粒体膜电位的损失及Bcl-2和Bax蛋白在线粒体的变化，细胞质释放细胞色素C和凋亡诱导因子，过氧化氢酶抑制ZEA诱导RAW264.7细胞减少。

ZEA作用于免疫系统的主要靶器官是脾脏，可导致脾脏淋巴细胞凋亡，进而使机体免疫功能降低。马勇江等[7]研究ZEA对离体培养脂多糖活化小鼠脾脏淋巴细胞具有显著促凋亡作用，且促进强度与其剂量呈依赖性关系。但目前关于ZEA对鸡脾脏细胞凋亡方面的研究较少。因此，本研究以原代培养鸡脾脏淋巴细胞为模型，从细胞水平上研究镰刀菌毒素ZEA染毒对鸡脾脏淋巴细胞的凋亡及其调控基因的影响，以便阐明ZEA染毒对鸡脾脏淋巴细胞的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验动物：东北农业大学动物医学院动物中心提供的40~60日龄健康的伊莎公鸡。

胎牛血清（FBS）购自Gibco公司；4－羟乙基哌嗪乙磺酸（Hepes）、ZEA及无酚红的RPMI1640培养基均购自Sigma公司；细胞凋亡检测试剂盒[用异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白V（Annexin V-FITC）和碘化丙啶（PI）双染]购自美国ACTGene公司；2′,7′–二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)与罗丹明123(Rh123)购自美国Sigma公司；Trizol试剂盒、M-MLV反转录酶、DNA抽提试剂盒及RNA酶均购自Invitrogen公司；rTaq酶等PCR反应试剂购自

TaKaRa(大连)生物公司；溴化乙锭(EB)购自Sigma公司；鸡的Bax、Bak-1、Bcl-2、p53及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶－3（caspase-3）酶联免疫吸附测定（ELISA）检测试剂盒均购自上海生物公司。

1.2 试验方法

1.2.1 脾脏淋巴细胞悬液的制备、培养及处理

在无菌条件下，将鸡脾脏取出，放入盛有磷酸缓冲液（PBS）的培养皿里，用PBS轻轻洗涤脾脏周围的血液残渣，仔细剥去脾脏周围结缔组织，将其移入另一个盛有浸泡有200目网筛的PBS的培养皿中，用镊子将脾脏放在200目铜网上，用20 mL一次性注射器的内芯轻轻研磨，过滤，将滤液适当稀释成一定浓度的细胞悬液，再将细胞悬液移入预先装有鸡淋巴分离液离心管里，即缓缓以1∶1体积比将细胞悬液移入到鸡淋巴分离液上层，2 000 r/min常温离心15 min，用巴氏吸管移取淋巴细胞，加入冷的PBS洗涤，1 500 r/min 4 ℃离心5 min，弃去上清液，加入不含毒素的RPMI1640完全培养液(加FBS)再洗涤1次，重悬，计数，并用台盼蓝检测细胞活力大于95%。

前期试验已检测染毒48 h时，ZEA的半抑制浓度（IC50）为（23.91±4.96） μg/mL。通过IC50筛选出ZEA的作用浓度为Z1组0.10 μg/mL、Z2组0.40 μg/mL、Z3组1.60 μg/mL、Z4组6.25 μg/mL和Z5组25.00 μg/mL[8]。

1.2.2 流式细胞仪测定细胞凋亡率和坏死率

染毒培养48 h时，收集细胞，1 500 r/min离心3 min，用PBS洗涤细胞3次。离心后，加500 μL Binding Buffer制备细胞悬液，再加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI，室温避光反应5~15 min，用流式细胞仪测定细胞凋亡率和细胞坏死率，同时以不加Annexin V-FITC及PI作为试剂对照。激发波长为488 nm，Annexin V-FITC的绿色荧光通过异硫氰酸荧光素（FITC）通道(FL-1，530 nm)检测，PI的红色荧光通过PI通道(FL-2，585 nm)检测。每个样品以10 000个细胞计数进行统计，数据由流式细胞仪的标准计算机程序分析获得。

1.2.3 细胞内活性氧(ROS)含量的测定

染毒培养48 h，收集细胞，1 500 r/min离心3 min，后用PBS洗涤细胞3次。选用对细胞内过氧化氢（H_2O_2）特异性结合的荧光染料DCFH-DA对细胞内ROS进行检测，用PBS悬浮

细胞，加入DCFH-DA染液使其终浓度为100 μmol/L，混匀，37 ℃避光孵育30 min，PBS洗涤3次，在流式细胞仪测定其平均荧光强度(激发波长488 nm，发射波长530 nm)。

1.2.4 细胞线粒体膜电位的测定

染毒培养48 h，收集细胞，1 500 r/min离心3 min，后用PBS洗涤细胞2~3次。选用对线粒体特异性结合的荧光染料罗丹明123对线粒体膜电位进行检测，用PBS悬浮细胞，加入罗丹明123染液使其终浓度为5 μg/mL，混匀，37 ℃避光孵育30 min，PBS洗涤3次，在流式细胞仪测定其平均荧光强度(激发波长488 nm，发射波长530 nm)。

1.2.5 上清液中Bc1-2、p53、Bax、Bak-1和caspase-3含量测定(ELISA法)

染毒培养48 h后，收集细胞培养上清液，3 000 r/min离心20 min，吸取上清，－20 ℃保存备用，按ELISA试剂盒说明书测定上清液中Bc1-2、p53、Bax、Bak-1和caspase-3的含量。

1.2.6 细胞内凋亡调控基因*Bc1*-2、*p*53、*Bax*、*Bak*-1及caspase-3的mRNA表达测定

按RNA提取试剂盒说明书操作，最终获得组织总RNA；取组织总RNA适量，按PrimeScript RT-PCR Kit说明书进行反转录，将提取的RNA转化为cDNA，cDNA保存于-80 ℃备用或立即用于PCR。根据GenBank中发表的鸡的β-肌动蛋白（β-actin）(L08165)、*Bc1*-2(Z11961.1)、*p*53(X13057.1)、*Bax*(XM_422067.2)、*Bak*-1(NM_001030920.1)和caspase-3(NM_204725.1)的全基因序列，应用Prime 5.0软件设计特异的上、下游引物，并经GenBank Blast进行同源性检索后由Invitrogen公司(上海)合成。引物序列及参数见表1。

表1 引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters

基因 Genes	引物序列 Primer sequences （5’→3’）	扩增长度 Amplification length/bp	序列号 Serial number
β肌动蛋白 β-actin	F：CACCACAGCCGAGAGAGAAAT R：TGACCATCAGGGAGTTCATAGC	135	L08165
B淋巴细胞瘤－2相关X蛋白 *Bax*	F：GTGATGGCATGGGACATAGCTC R：TGGCGTAGACCTTGCGGATAA	90	XM_422067.2

*p*53	F：GAGATGCTGAAGGAGATCAATGAG R：GTGGTCAGTCCGAGCCTTTT	145	X13057.1
B淋巴细胞瘤－2 *Bcl*-2	F：ATCGTCGCCTTCTTCGAGTT R：ATCCCATCCTCCGTTGTCCT	150	Z11961.1
Bak-1	F：ATGGATGCCTGTCTGTCCTGTTC R：GCAGAGCAGTCCAAAGACACTGA	106	NM_001030920.1
半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶－3 Caspase-3	F：ACTCTGGAATTCTGCCTGATGACA R：CATCTGCATCCGTGCCTGA	129	NM_204725.1

相关基因 cDNA 的 PCR 反应体系包括 cDNA、上下游引物、高保真酶、Premix 和 ddH_2O，反应条件为 95 ℃预变性 30 s，按 95 ℃ 变性 5 s，60 ℃退火 34 s，40 个循环，4 ℃终止反应；取 PCR 扩增产物于 1.5％琼脂糖凝胶电泳 2 h，凝胶成像仪拍照记录 PCR 结果。

1.2.7 数据分析

采用 REST 软件(Pfaffl)分析毒素处理样品各目的基因 mRNA 的表达丰度，应用 SPSS 13.0 软件对数据进行显著性 F 检验及相关性分析；其中上述各项指标的测定重复 3 个不同批次的细胞，每批细胞每个样本重复 3 次，数据以平均值±标准差表示，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结 果

2.1 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞凋亡率和坏死率的影响

ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞凋亡率和坏死率的影响见表 2。ZEA 染毒时，细胞凋亡率各组间差异显著($P<0.05$)。细胞坏死率除 Z2 组和 Z3 组差异不显著($P>0.05$)外，其余各组间差异均极显著($P<0.01$)。当 ZEA 浓度达到 6.25 μg/mL 以上，细胞凋亡和坏死均有所减缓。

除 Z5 组较 Z4 组淋巴细胞的凋亡率和坏死率均有所下降外，其余试验组的细胞凋亡率和坏死率均随 ZEA 浓度的升高而升高，各 ZEA 组细胞凋亡率和坏死率均极显著高于对照组($P<0.01$)；且同浓度下，脾脏淋巴细胞的凋亡率均高于坏死率，表明 ZEA 染毒主要导致脾脏淋巴细胞凋亡。

表 2 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞凋亡率和坏死率的影响

Table 2 Effects of ZEA on the apoptotic rate and necrotic rate of chicken splenic lymphocytes

组别 Groups		凋亡率 Apoptotic rate/%	坏死率 Necrotic rate/%
对照 Control		8.40±0.20^{Ef}	2.30±0.03^{Ee}
	Z1	24.40±1.50^{De}	4.10±0.20^{Dd}
	Z2	25.90±2.40^{Dd}	4.90±0.12^{Cc}
ZEA	Z3	29.30±2.70^{Cc}	4.90±0.30^{Cc}
	Z4	51.10±3.40^{Aa}	12.10±0.80^{Aa}
	Z5	40.40±3.00^{Bb}	10.70±0.32^{Bb}

同列数据肩标不同大写字母表示差异极显著(P<0.01)，不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，相同小写字母表示差异不显著(P>0.05)。下表同。

In the same column, values with different capital letter superscripts mean extremely significant difference (P<0.01), and with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with the same small letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). The same as below.

2.2 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞内 ROS 与线粒体膜电位的影响

ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞内 ROS 与线粒体膜电位的影响见表 3。ZEA 染毒 48 h，鸡脾脏淋巴细胞 ROS 含量随毒素浓度的升高而增加，各 ZEA 组 ROS 含量极显著高于对照组(P<0.01)；而线粒体膜电位随毒素浓度的升高而降低(Z3 组除外)，各 ZEA 组线粒体膜电位极显著低于对照组(P<0.01)。ROS 含量除 Z3 组与 Z4 组间差异不显著(P>0.05)外，其余各组间差异显著(P<0.05)；ZEA 组间线粒体膜电位差异显著(P<0.05)。

表 3 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞内 ROS 与线粒体膜电位的影响

Table 3 Effects of ZEA on the intracellular ROS and mitochondrial membrane potential in chicken splenic lymphocytes

组别 Groups		细胞内活性氧 ROS	线粒体膜电位 Mitochondrial membrane potential
对照 Control		1.43±0.03^{De}	5.92±0.07^{Aa}
	Z1	4.03±0.12^{Cd}	5.54±0.10^{Bb}
ZEA	Z2	4.78±0.15^{Bc}	4.58±0.15^{Dd}
	Z3	5.23±0.16^{Bb}	5.32±0.10^{Cc}

Z4	5.31±0.20[Bb]	4.06±0.10[Ef]
Z5	10.15±0.30[Aa]	4.15±0.20[Ee]

2.3 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞培养上清液中 Bc1-2、p53、Bax、Bak-1 和 caspase-3 含量的影响

ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞培养上清液中 Bc1-2、p53、Bax、Bak-1 和 caspase-3 含量的影响见表 4。针对 Bcl-2 含量，除 Z1 组与 Z2 组间差异不显著(P>0.05)外，其余各组间差异均极显著（P＜0.01）；针对 p53 的含量，各组间均差异显著(P<0.05)；针对 Bax 含量，Z1 组、Z2 组、Z3 组和对照组之间差异均不显著(P>0.05)，Z4 组和 Z5 组之间及与上述各组间差异极显著(P<0.01)；针对 Bak-1 含量，各组间差异均显著(P<0.05)；针对 caspase-3 含量，除 Z3 组和 Z4 组间差异不显著(P>0.05)外，其余各组间均差异显著(P<0.05)；。

由此表明，p53、Bax、Bak-1 和 caspase-3 含量随毒素浓度的升高而增加，Bcl-2 含量随毒素浓度的升高而降低，具有显著的剂量依赖关系，

表 4 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞培养上清液中 Bc1-2、p53、Bax、Bak-1 和 caspase-3 含量的影响

Table 4 Effects of ZEA on the contents of Bc1-2, p53, Bax, Bak-1 and caspase-3 in supernatants of chicken splenic lymphocytes

组别 Groups		B 淋巴细胞瘤－2 Bcl-2/(μg/L）	p53/(pg/L）	B 淋巴细胞瘤－2 基因相关 X 蛋白 Bax/(μg/mL）	Bak-1/(ng/L)	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶－3 Caspase-3/(pmol/L）
对照 Control		48.84±1.51[Aa]	270.46±20.72[Cf]	5.20±0.06[Cc]	170.31±6.72[Cf]	11.18±1.52[Ce]
ZEA	Z1	31.76±1.45[Bb]	282.02±7.54[Ce]	5.21±0.33[Cc]	179.81±2.24[Ce]	13.45±1.47[Cd]
	Z2	30.73±1.63[Bb]	307.36±5.66[Cd]	5.31±0.15[Cc]	214.64±5.22[Cd]	21.34±0.45[Bc]
	Z3	25.21±1.31[Cc]	588.78±23.71[Bc]	5.73±0.20[Cc]	331.80±2.24[Bc]	26.70±0.53[ABb]
	Z4	20.13±1.42[Dd]	632.80±13.20[Bb]	8.67±0.21[Bb]	410.96±3.73[Ab]	27.28±0.50[ABb]
	Z5	14.74±1.27[Ee]	818.19±11.32[Aa]	11.17±0.40[Aa]	447.72±26.03[Aa]	30.99±0.60[Aa]

2.4 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞 *Bc1*-2、*p53*、*Bax*、*Bak*-1 和 caspase-3 mRNA 表达的影响

ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞 *Bc1*-2、*p53*、*Bax*、*Bak*-1 和 caspase-3 mRNA 表达的影响见表 5。针对 *Bcl*-2 mRNA 表达量，Z1 组、Z2 组和 Z3 组间 *Bax*/*Bcl*-2 值差异不显著(P>0.05)，但显著高于对照组(P<0.05)，Z4 组和 Z5 组极显著高于其他各组(P<0.01)；针对

p53 mRNA 表达量，各 ZEA 组极显著高于对照组(P<0.01)；针对 *Bax* mRNA 表达量，各组间差异显著(P<0.05)；针对 *Bak*-1 mRNA 表达量，除 Z2 组和 Z3 组间差异不显著(P>0.05)外，其余各组间差异极显著(P<0.01)；针对 caspase-3 mRNA 表达量，对照组、Z1 组、Z2 组和 Z3 组间差异不显著(P>0.05)，Z4 组和 Z5 组极显著高于其他各组(P<0.01)，且 2 组间差异极显著(P<0.01)。

由此表明，除 caspase-3 mRNA 表达量在 Z1 组、Z2 组和 Z3 组略小于对照组外，*Bax*/*Bcl*-2 值以及 *Bax*、*Bak*-1 和 caspase-3 的 mRNA 表达量随毒素浓度的升高而增加，具有显著的剂量依赖关系。

表 5 ZEA 对鸡脾脏淋巴细胞 *Bcl*-2、*p*53、*Bax*、*Bak*-1 和 caspase-3 mRNA 表达的影响

Table 5 Effects of ZEA on the mRNA expression levels of *Bcl*-2, *p*53, *Bax*, *Bak*-1 and caspase-3 in chicken splenic lymphocytes

组别 Groups		B 淋巴细胞瘤－2 基因相关 X 蛋白/B 淋巴细胞瘤－2 *Bax*/*Bcl*-2	*p*53	B 淋巴细胞瘤－2 基因相关 X 蛋白 *Bax*	*Bak*-1	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶－3 Caspase-3
对照 Control		1.00 ± 0.04^{De}	1.00 ± 0.02^{Cf}	1.00 ± 0.11^{Cf}	1.02 ± 0.08^{Ee}	0.98 ± 0.03^{Cc}
ZEA	Z1	1.17 ± 0.04^{CDcd}	1.23 ± 0.08^{Bd}	1.25 ± 0.01^{Be}	1.37 ± 0.05^{Dd}	0.96 ± 0.05^{Cc}
	Z2	1.21 ± 0.06^{CDcd}	1.46 ± 0.10^{Ab}	1.40 ± 0.03^{ABd}	1.52 ± 0.04^{Cc}	0.94 ± 0.05^{Cc}
	Z3	1.31 ± 0.02^{Cc}	1.36 ± 0.09^{Bc}	1.43 ± 0.09^{ABc}	1.55 ± 0.05^{Cc}	0.93 ± 0.04^{Cc}
	Z4	1.57 ± 0.06^{Bb}	1.52 ± 0.07^{Aa}	1.44 ± 0.10^{ABb}	2.12 ± 0.05^{Bb}	1.33 ± 0.03^{Bb}
	Z5	3.23 ± 0.15^{Aa}	1.32 ± 0.03^{Bd}	1.59 ± 0.08^{Aa}	3.18 ± 0.04^{Aa}	3.73 ± 0.25^{Aa}

3 讨 论

本实验室前期研究表明，ZEA 在体内试验中可以诱导小鼠肾脏细胞、脑细胞和肝脏细胞的凋亡[8-11]，在体外试验中可以诱导猪脾脏淋巴细胞凋亡[12]。在本试验中，ZEA 可以诱导体外培养鸡脾脏淋巴细胞凋亡，结果和前期试验结果一致。

线粒体在氧化代谢过程中产生大量 ROS。在自由基产生过多或抗氧化防御系统作用减弱时，机体不能有效清除线粒体内 ROS，造成蓄积，过量蓄积的 ROS 可氧化线粒体渗透性转运孔上的相应氧化还原敏感位点，导致线粒体膜电位降低、线粒体肿胀和进一步 ROS 产生，进一步造成线粒体的氧化损伤[13]。本研究结果表明 ZEA 染毒使鸡脾脏淋巴细胞内 ROS 大量积累，线粒体膜电位极显著下降，和上述研究一致。

细胞凋亡的信号传导途径是经过特殊的死亡信号激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶系统来实现的[14]。caspase-3是在多种诱导剂刺激后导致凋亡的关键酶，它的活化预示着细胞凋亡执行阶段的开始。正常情况下，它以酶原形式存在于胞质中，当细胞接受凋亡刺激时，它

被系列反应激活，进而诱导细胞发生凋亡[15-17]。ZEA可诱导猪卵巢颗粒细胞凋亡依赖半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶凋亡通路[18]。本研究结果显示，ZEA能够诱导体外培养鸡脾脏淋巴细胞caspase-3的mRNA表达增加，分泌在上清液中的caspase-3蛋白也增加，且呈剂量效应关系，和上述试验结果一致。

在细胞凋亡过程中，p53蛋白起着至关重要的作用。p53蛋白主要集中于核仁区，能与DNA特异结合，具有明显的细胞转化抑制作用，对保护细胞基因组DNA的完整性具有重要作用。如果DNA受到外来损伤，p53可作为转录因子诱导一系列下游基因的表达，介导细胞停止在G期，使DNA有足够的时间得到修复。如果DNA损伤严重，修复失败，并且不可逆则p53启动凋亡程序诱导细胞凋亡[19]。Ayed Boussema等[20]研究ZEA对人的肝细胞是激活p53，通过p53途径以剂量依赖方式诱导细胞凋亡。Yu等[6]研究ZEA对RAW264.7巨噬细胞的毒性作用，其中p53的激活起到了关键作用。Bouaziz等[21]研究ZEA对人的肝癌细胞的毒性，得出ZEA引发p53依赖的凋亡通路致细胞凋亡的分子机制。本试验结果也表明ZEA从基因水平改变了鸡脾脏淋巴细胞*p*53的表达，干扰了p53凋亡通路的调控，从而诱发鸡脾脏淋巴细胞凋亡。

Bcl-2家族蛋白在调节通过线粒体使细胞凋亡过程中起着至关重要的作用，Bcl-2蛋白主要分布于线粒体膜、核膜及内质网膜上，参与维持线粒体膜的完整性，防止细胞色素C的释放，阻止凋亡的“内源性激活”，是细胞的抗凋亡成员[22]。当Bax形成同源二聚体Bax-Bax时，诱导细胞凋亡，随着*Bcl*-2表达量的上升，越来越多的Bax二聚体分开，与Bcl-2形成比Bax-Bax二聚体更稳定的Bax-Bcl-2的异二聚体，从而中和了Bax-Bax二聚体调节细胞凋亡的作用，即细胞内Bax/Bcl-2的值对于决定细胞接受刺激信号后存活与否起关键作用。*Bcl*-2过量表达细胞存活，*Bax*过量表达则细胞凋亡[23]。Yuan等[24]研究得出ZEA诱导小鼠雄性生殖细胞的凋亡基因*Bax*的mRNA的表达增加，*Bcl*-2的mRNA表达减少。Yu等[25]研究ZEA对人的乳腺癌MCF-7细胞的研究，发现ZEA显著抑制细胞凋亡，存在剂量依赖性，Western blot和多重RT-PCR分析显示，抗凋亡的Bcl-2蛋白质和mRNA水平上调，促凋亡的Bax下调，说明ZEA具有雌激素活性，并能促进MCF-7细胞通过细胞周期由G0/G1期减少和S期的显著增加的进展，通过*Bcl*-2表达调控抑制细胞凋亡。本试验结果显示，在ZEA对鸡脾脏淋巴细胞

作用下，*Bak*-1的表达均有所升高，*Bax*/*Bcl*-2值也增加，其蛋白含量也随之增加或减少。

4 结 论

① 本试验表明，随 ZEA 浓度升高，细胞凋亡调控蛋白 p53、Bax、Bak-1 和 caspase-3 的含量升高，Bcl-2 含量却下降；ZEA 上调 *Bcl*-2 家族基因（*Bax* 和 *Bak*-1）、*p*53 基因和 caspase-3 基因表达，抑制 *Bcl*-2 家族基因中 *Bcl*-2 基因表达。

② ZEA 通过激活 p53 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶通路而诱导细胞凋亡增加，并且凋亡是由氧化应激引起。

参考文献：

[1] KIM I H,SON H Y,CHO S W,et al.Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats[J].Toxicology Letters,2003,138(3):185–192.

[2] 余增丽,张立实,吴德生.玉米赤霉烯酮对乳腺癌细胞MCF-7增殖和凋亡的影响[J].中国预防医学杂志,2005,39(5):328–331.

[3] 邓友田,袁慧.玉米赤霉烯酮毒性机理研究进展[J].动物医学进展,2007,28(2):89–92.

[4] 符达.玉米赤霉酮对SD大鼠卵巢p53基因第八外显子突变的研究[D].硕士学位论文.长沙:湖南农业大学,2005.

[5] 曹林枝.p53基因及其分子生物学作用[J].中国临床医药,2003,5(1):77–80.

[6] YU J Y,ZHENG Z H,SON Y O,et al.Mycotoxin zearalenone induces AIF-and ROS-mediated cell death through p53-and MAPK-dependent signaling pathways in RAW264.7 macrophages[J].Toxicology in Vitro,2011,25(8):1654–1663.

[7] 马勇江,许利娜,李玉谷,等.玉米赤霉烯酮对小鼠脾淋巴细胞凋亡的影响[J].家畜生态学报,2009,30(1):52–56.

[8] 任志华,王亚超,邓俊良.脱氧雪腐镰刀菌烯醇与玉米赤霉烯酮联合暴露对体外培养鸡脾脏淋巴细胞内环境稳态的影响[J].动物营养学报,2017,29(8):2836–2842.

[9] LIANG Z,REN Z H,GAO S,et al.Individual and combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on mouse kidney[J].Environmental Toxicology and

Pharmacology,2015,40(3):686–691.

[10] REN Z H,DENG H D,DENG Y T,et al.Effect of the *Fusarium toxins*,zearalenone and deoxynivalenol,on the mouse brain[J].Environmental Toxicology and Pharmacology,2016,46:62–70.

[11] 高爽,邓又天,张超,等.脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮及其联合染毒对小鼠肝脏功能及肝细胞凋亡的影响[J].中国兽医学报,2015,35(12):2021–2026.

[12] REN Z H,DENG H D,DENG Y T,et al.Combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative injury and apoptosis in porcine splenic lymphocytes *in vitro*[J].Experimental and Toxicologic Pathology,2017,69(8):612–617.

[13] FOSTER K A,GALEFFI F,GERICH F J,et al.Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration[J].Progress in Neurobiology,2006,79(3):136–171.

[14] POLYAK K,XIA Y,ZWEIER J L,et al.A model for P53 induced apoptosis[J].Nature,1997,389(6648):300–305.

[15] SPRINGER J E,NOTTINGHAM S A,MCEWEN M L,et al.Caspase-3 apoptotic signaling following injury to the central nervous system[J].Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,2001,39(4):299–307.

[16] BUDIHARDJO I,OLIVER H,LUTTER M,et al.Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis[J].Annual Review of Cell and Developmental Biology,1999,15:269–290.

[17] NI B,WU X,DU Y,et al.Cloning and expression of rat in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons[J].Neuroscience,1997,17(5):1561–1569.

[18] ZHU L,YUAN H,GUO C Z,et al.Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3- and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway[J].Journal of Cellular Physiology,2012,227(5):1814–1820.

[19] 李金龙.镉致鸡脾脏淋巴细胞凋亡机理的研究[D].硕士学位论文.沈阳:东北农业大学,2004.

[20] AYED BOUSSEMA I,BOUAZIZ C,RJIBA K,et al.The mycotoxin zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway[J].Toxicology *in Vitro*,2008,22(7):1671–1680.

[21] BOUAZIZ C,EL DEIN O S,EL GOLLI E E,et al.Different apoptotic pathways induced by zearalenone,T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells[J].Toxicology,2008,254(1/2):19–28.

[22] ANTONSSON B,MARTINOU J C.The Bcl-2 protein family[J].Experimental Cell Research,2000,256(1):50–57.

[23] SEDLAK T W,OLTVAI Z N,YANG K,et al.Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax[J].Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America,1995,92(17):7834–7838.

[24] YUAN H,DENG Y T,YUAN L Y,et al.*Gynostemma pentaphyllum* protects mouse male germ cells against apoptosis caused by zearalenone via Bax and Bcl-2 regulation[J].Toxicology Mechanisms and Methods,2010,20(3):153–158.

[25] YU Z L,ZHANG L S,WU D S,et al.Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells[J].Ecotoxicology and Environmental Safety,2005,62(3):441–446.

Effects of Zearalenone on Apoptosis of Chicken Splenic Lymphocytes in Vitro[i]

LI Xinhong[1] ZHENG Ruoyu[1] GU Yanfei[1] TAO Siyi[1] REN Zhihua[1] WANG Yachao[2] DENG Junliang[1*]

(1. *College of Veterinary Mmedicine*, *Sichuan Agricultural University*, *Chengdu* 611130, *China*; 2. *Southwest University of Science and Technology*, *Mianyang* 621010, *China*)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of zearalenone (ZEA) on apoptosis of chicken splenic lymphocytes *in vitro*. Chicken splenic lymphocytes were treated with 0 (control), 0.10, 0.40, 1.60, 6.25 and 25.00 μg/mL ZEA for 48 h *in vitro*, and the apoptosis rate, necrotic rate, cell mitochondria membrane potential, intracellular reactive oxygen species (ROS) and the mRNA expression levels of B lymphocytoma-2 (*Bcl-2*), Bcl-2 associated X protein (*Bax*), *Bak*-1, *p*53 and caspase-3 as well as their protein

contents in the supernatant were measured. The results showed that compared with the control group, ZEA significantly or extremely significantly increased the apoptosis rate, necrotic rate, ROS content, contents of p53, Bax, Bak-1 and caspase-3 in the supernatant and the increased mRNA expression levels of intracellular *p*53, *Bax*, *Bak*-1 and caspase-3 (P<0.05 or P<0.01), which were higher and higher with ZEA concentration increasing. Whereas the mitochondria membrane potential and Bcl-2 content in supernatant were extremely decreased in ZEA groups compared with the control group (P<0.01). These results suggest that ZEA induces apoptosis of chicken splenic lymphocytes in a dose-dependent manner.

Key words: zearalenone; chicken splenic lymphocytes; apoptosis; mitochondria; reactive oxygen species

---

*Corresponding author, professor, E-mail: dengjl213@126.com （责任编辑　田艳明）